

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-505084

(43) 公表日 平成9年(1997)5月20日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 48/00	ACD	9051-4C	A 6 1 K 48/00
9/12		7329-4C	9/12
31/70		9051-4C	31/70
35/76		9283-4C	35/76
C 0 7 H 21/04		8615-4C	C 0 7 H 21/04
			B
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 45 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平7-524374  
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995)3月17日  
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)9月20日  
 (86) 国際出願番号 P C T / E P 9 5 / 0 1 0 0 6  
 (87) 国際公開番号 W O 9 5 / 2 5 8 0 0  
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)9月28日  
 (31) 優先権主張番号 P 4 4 1 0 1 8 8 . 0  
 (32) 優先日 1994年3月24日  
 (33) 優先権主張国 ドイツ (D E)  
 (31) 優先権主張番号 9 4 1 1 2 1 6 5 . 9  
 (32) 優先日 1994年8月4日  
 (33) 優先権主張国 欧州特許機構 (E P)

(71) 出願人 ベーリンガー マンハイム ゲゼルシャフト  
 ミット ベシュレンクテル ハフツング  
 ドイツ連邦共和国, デー-68298 マンハイム (番地なし)  
 (72) 発明者 セーベル, ステファン  
 ドイツ連邦共和国, デー-82377 ペンツベルク, ビルケンシュトラッセ 25  
 (72) 発明者 リューゲル, リューディガー  
 ドイツ連邦共和国, デー-82386 フグルフィンク, ビルケンシュトラッセ 11  
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

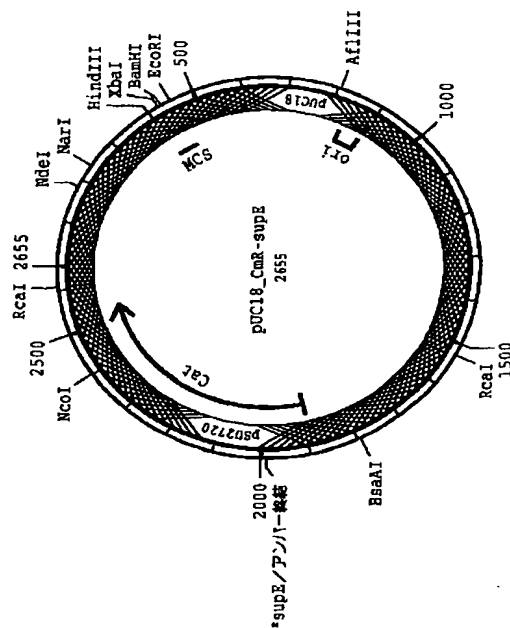
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗生物質耐性遺伝子を含まないDNAベクターを使用する遺伝子治療方法

## (57) 【要約】

遺伝子治療による哺乳類又はヒトの治療のための医薬の製造のためのベクターDNAの使用であって、そのベクターDNAが、内因性遺伝子の発現、あるいは、そのベクターDNAにより、その哺乳類又はヒトの細胞内に導入された遺伝子の発現の、調節、校正又は活性化を引き起こしそのベクター核酸が、活性又はヒト関連の抗生物質耐性遺伝子を含まないような、使用。このようなベクターDNAは、気管、消化管及び皮膚の遺伝子治療処置に特に好適である。

Fig. 1



**【特許請求の範囲】**

1. 遺伝子治療による哺乳類又はヒトの治療のための医薬剤の製造のためのベクターDNAの使用であって、そのベクターDNAが、内因性遺伝子の発現、あるいは、そのベクターDNAによりその哺乳類又はヒトの細胞内に導入された遺伝子の発現の、調節、校正又は活性化を引き起こし、そのベクター核酸が、活性抗生物質耐性遺伝子を含まないような、使用。

2. 遺伝子治療によるヒトの治療のための医薬剤の製造のためのベクターDNAの使用であって、そのベクターDNAが、内因性遺伝子の発現、あるいは、そのベクターDNAによりそのヒト細胞内に導入された遺伝子の発現の、調節、校正又は活性化を引き起こし、そのベクター核酸が、ハイグロマイシン、クロラムフェニコール、スペクチノマイシン、プラスティシジンS、フレオマイシン、ブレオマイシン、プロマイシン、アプラマイシン又はテトロナシンについての耐性遺伝子を含むような、使用。

3. 遺伝子治療処置が、気管内、腸管内又は皮膚表面上で行われる、請求項1又は2に記載の使用。

4. ベクターDNAが、嚢胞性繊維症のための内因性遺伝子の発現の、調節又は活性化を引き起こし、又はその嚢胞性繊維症をコードするような、請求項1～3のいずれか1項に記載の使用。

5. 医薬剤が、気管内での適用のためのエアロゾルとして製造される、請求項4に記載の使用。

6. 哺乳類細胞内での、内因性嚢胞性繊維症遺伝子の、調節、活性化又は校正を引き起こす遺伝子又は遺伝子断片を含み、あるいは、哺乳類細胞内で発現されることができる嚢胞性繊維症遺伝子を含むベクターDNAであって、このベクターDNAが、失活された抗生物

質耐性遺伝子又は栄養要求性マーカーをコードする遺伝子を含むような、ベクターDNA。

7. 哺乳類細胞内での、内因性嚢胞性繊維症遺伝子の、調節、活性化、又は校正を引き起こす遺伝子又は遺伝子断片を含み、あるいは、哺乳類細胞内で発現さ

れることができる嚢胞性繊維症遺伝子を含むベクターDNA であって、このベクターDNA が、ハイグロマイシン、クロラムフェニコール、スペクチノマイシン、プラスティシジンS、フレオマイシン、ブレオマイシン、プロマイシン、アプラマイシン又はテトロナシンについての耐性遺伝子を含むような、ベクターDNA 。

## 【発明の詳細な説明】

## 抗生物質耐性遺伝子を含まないDNA ベクターを使用する遺伝子治療方法

本発明は、遺伝子治療における抗生物質耐性遺伝子を含まないベクターDNA の使用及び遺伝子治療のための医薬剤の製造のためのこれらのベクターの使用に関する。

体細胞の遺伝子治療は、例えば、レトロウイルス・ベクター、他のウイルス・ベクターを使用して又は非ウイルス性遺伝子移入により行われることができる（レビューのためには、T. Friedmann, Science 244(1989), 1275, Morgan 1993, RAC DATA MANAGEMENT Report, June 1993 を参照のこと。）。

遺伝子治療に好適なベクター系は、例えば、レトロウイルス (Mulligan, R. C . (1991) in Nobel Symposium 8 : Etiology of human disease at the DNA level (Lindsten, J. and Pattersun Editors), pages 143-189 Raven Press) 、アデノ随伴ウイルス (McLughlin, J. Virol. 62(1988), 1963)、ワクシニア・ウイルス (Moss et al., Ann. Rev. Immunol. 5 (1987), 305)、ウシ乳頭腫ウイルス (Rasmussen et al., Methods Enzymol. 139(1987), 642) 又はヘルペスウイルス群からのウイルス、例えば、エプスタイン・バー・ウイルス (Margolske et al ., Mol. Cell. Biol. 8 (1988), 2937) 又は単純ヘルペス・ウイルスである。

非ウイルス・デリバリー系も知られている。“はだか(Naked)”の核酸、好ましくは、DNA が、通常、補助物質、例えば、移入剤（リポソーム、デンドロマー (dendromers) 、ポリリシン・トランスフェリン結合体 (Wagner, 1990) と一緒に、これの又は核酸のため

に使用される (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(1987), 7413)

治療的な量において遺伝子治療のために使用されることが出来る核酸を提供するために、その治療的適用の前にこれらの核酸を増幅することが必要である。これは、その核酸上に置かれたマーカー遺伝子及びその遺伝子産物を利用する少なくとも1の選択段階を含む。一般的な選択マーカーは、例えば、抗生物質、例えば、アンピシリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、カナマイシン、

ネオマイシン及びテトラサイクリンに対する耐性を仲介する遺伝子である (Davies et al., Aun. Rev. Microbiol. 32(1978)469)。

遺伝子治療のためのいくつかのプロトコルであって、未だ動物実験の段階にあるか (Alton, 1993; WO 93/1224; Hyde, 1993, Debs, 1991) 又は既に、患者に対する臨床試験にあるか (Nabel, 1993, 1994) のいずれかであるものが既に知られている。pBR322又はpUC 18/19に基づくベクターであってバクテリアの選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子を担持するものが、これらのプロトコルにおいて通常、使用される。

核酸が遺伝子治療処置において投与されるとき、気管及び消化管内に及び皮膚上に存在するバクテリアがその核酸を取り込むことができる。しかしながら、このマーカーが活性な抗生物質耐性遺伝子であるとき、これは、望ましくない副作用としてその患者において抗生物質耐性を作り出すことができる。これは、嚢胞性繊維症 (cystic fibrosis) が遺伝子治療により処置されるときに特に短所となる。このケースにおいては、大量のベクター核酸が、プラスミドDNA として又は移入剤としてリポソームを用いたエアロゾルとして (Alton 1993)、その患者に投与される。

嚢胞性繊維症疾患をもつ患者は、通常さらに、普通には抗生物質

、例えば、ペニシリンを投与することにより治療される、例えば、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) による呼吸器のバクテリア感染を患う。これ故、これらの抗生物質に対する患者の耐性は、欠点である。

CFTRプラスミド/リポソーム結合体によるCF遺伝子治療のために先に記載されたプロトコル及びインビトロ又は動物実験の刊行物は、バクテリアの選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子を含むpUC 18/19又はpBR322に基づくベクターを使用する (Alon, 1993; WO 93/1224; Hyde, 1993)。

アンピシリン耐性遺伝子をもつpUC 又はpBR に基づく一般的な大腸菌 (*E. coli*) ベクター (Nabel, 1992; Lori, 1994; Cotten, 1994; Lew, 1994 etc.) は、他のインビトロ遺伝子治療プロトコルにおいても及びはだかDNA 又はDNA/移入系結

合体を用いたインビトロ又は動物モデル試験の刊行物中においても使用される。

本発明は、そのベクターの核酸が、活性な抗生物質耐性遺伝子を全く含まないことを特徴とするベクターDNAにより哺乳類又はヒトの細胞内に導入された遺伝子の発現又は内因性遺伝子の発現の調節、校正又は活性化をそのベクターが引き起こすような遺伝子治療による、哺乳類又はヒトの治療のための医薬剤を作り出すためのベクターDNAの使用に関する。

本医薬剤は、好ましくは、エアロゾルとして投与される。

ベクターDNAであって、欠陥遺伝子を校正し、無傷の遺伝子を導入し又は正しい遺伝子座において交換されることができるものが、特に好ましくは使用される。ベクターは、本発明の意味においては、原核生物プラスミドに基づく非ウイルス性DNA分子として理解される。このDNA分子はさらに、好ましくは発現可能な遺伝子である

、遺伝子治療プロセスにおいて伝達されるべきDNAを含む。

非ウイルスDNAは、本発明の意味において、このDNAが感染性ウイルス粒子の成分ではなく、そして無傷のウイルス・ゲノムを含まないことを意味すると理解される。しかしながら、この非ウイルスDNAは、ウイルス配列、例えば、調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー）、転写終結、複製起点又はウイルス遺伝子、例えば、単純ヘルペス・ウイルスからのチミジン・キナーゼ遺伝子を含む。

このようなベクターDNAは、特に好ましくは、ヒトにおける嚢胞性繊維症の治療のために使用される。これに好適な遺伝子は、例えば、WO 91/02796中に記載されている。これは、遺伝子治療による嚢胞性繊維症治療のためのベクターの作出及び使用についても記載している。

DNAベクターは、そのベクターが哺乳類又はヒトにおける表面と直接に接触するようになるような遺伝子治療に好適である。このような表面は、例えば、呼吸管及び消化管並びにその皮膚の表面である。

本発明はさらに、哺乳類細胞内で嚢胞性繊維症遺伝子の発現の活性化、調節又は校正を引き起こす遺伝子又は遺伝子断片(CFTR遺伝子、嚢胞性繊維症トランス

メンブタン伝導調節遺伝子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene))を含み、あるいは哺乳類細胞がそのベクターDNAによりトランスフェクトされた後に、このベクターが失活した抗生物質耐性遺伝子又は栄養要求マーカをコードする遺伝子をさらに含むことを特徴とするようなこの遺伝子の発現をもたらすCFTR遺伝子を含む、ベクターDNA に関する。

本発明に係る好適な核酸は、好ましくは、以下の方法により調製

されることができる：

1. 中立マーカをもつプラスミド：

— これらは、ベクター（例えば、pUC 18又はpBR322）内での耐性遺伝子（例えば、Amp）の欠失及び抗生物質耐性を仲介しない中立マーカ（neutral marker）の導入により調製されることができる。

— これらのベクターは、例えば、適当な大腸菌（*E. coli*）株、例えば、X-Gol 寒天上の青に染まったコロニーにより検出されることができるXL1-ブルーにおける $\alpha$ -相補結合( $\alpha$ -complementation)により機能性 $\beta$ -ガラクトシダーゼを形成する中立マーカとしてpUC 18からのlacZ遺伝子断片を担持する。完全培地中でその発酵を行うことが好都合である。

2. 栄養要求マーカをもつプラスミド：

— ベクター内への、例えば、（ロイシン、プロリン、又はビオチン合成遺伝子をコーディングする）leu, thi, pro 又はbio 遺伝子の導入及び対応のleu, pro又はbio 遺伝子内に欠陥をもつ大腸菌（*E. coli*）株において得られたプラスミド構築物の形質転換。このプラスミドによりコードされた栄養要求マーカ遺伝子は、上記欠陥を補完する。

— ロイシン、プロリン又はビオチンを含まない最小培地中での選択圧下で種培養物（preculture）を培養する。

— 完全培地中で主培養物を発酵させることが好都合である。しかしながら、プラスミド構築物が適当な安定性をもつことを前もって確認することが必要である。このプラスミドが、例えば、肺微生物叢(flora)のバクテリアに伝達される場合、これらは、その伝達された栄養要求マーカを利用することができない。

### 3. 抗生物質耐性マーカー ( $AB^R$ ) :

失活された抗生物質耐性遺伝子の抑制 :

(supEの場合においては) グルタミン・コドンの又は (supFの場合においては) チロシン・コドンの代わりの1~2のアンバー終結コドン (UAG) の挿入は、未熟の翻訳終結、そしてそれ故、ナンセンス遺伝子産物を導く。 $AB^R$ 遺伝子は、このやり方で、失活されることができる。アンバー終結コドン挿入により失活された $AB^R$ 遺伝子は、supF-tRANs (そのアンバー終結におけるチロシンの取り込み) 又はsupE (そのアンバー終結におけるグルタミンの取り込み) の存在中で抑制される。すなわち、機能的な遺伝子産物 ( $AB^R$ ) が形成される。

治療用プラスミド内への安全な耐性マーカーの導入については、2つの可能性が存在する :

例えば、pUC 又はpBR ベクター内への、Amp の代わりにアンバー終結コドンにより失活された $AB^R$ 遺伝子の挿入、及び染色体上でsupE又はsupFサプレッサーtRNA遺伝子をコードしている大腸菌 (*E. coli*) 内で得られたプラスミドの形質転換。これは、抗生物質を含む培地上で得られた形質転換体の選択を可能にする。このようなプラスミド構築物が肺微生物叢のバクテリアにより取り込まれる場合、取り込まれた失活 $AB^R$ 遺伝子は、完全に読まれることはできず、そしてそれ故、 $AB^R$ を仲介しない。

バクテリア耐性遺伝子の代わりにたった203塩基対のサイズであるsupF tRNA遺伝子 (Seed, 1983) の挿入及び大腸菌 (*E. coli*) 生産株の染色体内へのアンバー終結コドンにより失活された $AB^R$ 遺伝子の挿入。このプラスミドコードsupF tRNAは、その染色体内に存在し、そして適当な抗生物質培地上での大腸菌 (*E. coli*) 生産株の成長を可能にするアンバー終結により失活された $AB^R$ を抑制する。得られたプラスミドは、 $AB^R$ 遺伝子をもたない。すなわち、例え

ば、肺微生物叢のバクテリア内に $AB^R$ 遺伝子を移入するリスクが全くない。

4. 大腸菌 (*E. coli*) - 特異的バクテリオファージ・ベクター、例えば、ヒトのために許容され、 $AB^R$ 遺伝子を担持せず、そしてds-DNAとして高収率で提供さ



れることができるM13mp18 内で、遺伝子カセットをクローン化することも好ましい。ファージ・ベクターが、例えば、上記肺微生物叢のバクテリアにより取り込まれる場合、その時、悪影響は全く予想されないであろう。

重要な適用は、遺伝子治療による嚢胞性繊維症の改良された治療である。嚢胞性繊維症の治療のための先に知られた方法は、例えば、W0 91/2796中に記載されている。遺伝子治療に好適なCFTR遺伝子も、その中に記載されている。

嚢胞性繊維症は、重篤な一遺伝子性の常染色体の劣性遺伝疾患であり 1 / 2500 出生の頻度をもつ。それは、呼吸管の機能における異常（外分泌腺の機能不全）、膵臓（粘液腺の分泌産物の増加産生及び増加粘度）、汗腺（汗中の増加電解質含量並びに液体及び電解質の同時損失）及び性腺における異常を導く上皮組織膜の欠陥性の電解質輸送を特徴とする。呼吸器の上皮の細胞による気管支粘膜内への塩化物イオンの不適当な分泌による呼吸障害が、最も頻度の高い臨床的顕示であり、そしてCF患者における死亡原因である。その応答性遺伝子をクローン化し、そしてサイケリック・アデノシン 1 リン酸（cAMP）－依存性塩化物イオン・チャンネル・タンパク質（CFTR＝嚢胞性繊維症トランスメンブラン伝導調節物質）（W0 91/2796）としてその遺伝子産物を特徴付けされてきた。

この疾患の異常病態生理学の知識、CFTRの構造及び機能並びにCFTR機能の障害に関連する突然変異は、今日、あまり有効ではない古典的な治療法に加えて、さまざまな遺伝子治療アプローチが行われ

ることを可能ならしめている。

2つの方法が、CF治療のための登録された及び最新の臨床プロトコールにおいて使用されている。このCFTR遺伝子は、CFTRアデノウイルス・ベクターの吸気により投与される。アデノウイルスは、自然に、肺上皮に感染する。最初の臨床的成功は、この方法によるが、数週間のほんの短時間の期間にわたり、そして不所望の毒性の副作用を伴って達成されてきた（Zabner & Welsh, 1993）。第2の方法は、吸気による気管内へのカチオン性リポソームと複合体化されたCFTRプラスミドの導入を含んで成る（Alton, 1993）。この場合においては、約 1 mgのプラスミド DNA/マウスが、マウスに投与され；ヒトの場合においては、そのプラスミド

ド投与量は、8.2kb のプラスミドのサイズにおいて約  $5 \times 10^{13}$  DNA 分子の数に対応する300-500  $\mu$ g プラスミド/患者のレンジ内にある (Alton, 1993; Whitsett, 1992)。この適用及び投薬は、本発明に従っても好ましい。

肺上皮細胞は、プラスミド導入量の少量だけを取り込むことができる。大部分のプラスミドは、患者により吐き出されるか又は飲み込まれるかのいずれかが、すなわち、大量がその環境（低圧安全室内の患者）及び患者の胃腸管に達することが予想される。

さまざまなバクテリア属が、その中のいくつかは日和見病原体、例えば、シェードモナス (*Pseudomonas*)、ハエモフィラス (*Haemophilus*)、腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*)、スタフィロコッカ (*Staphylococci*) 等としてそれ自体を顕出することができる肺微生物叢内に、置かれる (Manual of Clinical Microbiology, Balows, 1991)。

CF患者において強く増加される呼吸通路の領域内での粘性の、タンパク質に富む分泌物のバクテリアのコロニー化は、しばしば、気管支炎及び肺炎の重篤なケースの原因である。CF患者は、とりわけ

、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenza*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 及びブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) による気管支及び肺の感染に晒され (Cystic Fibrosis, Dodge, 1993, Fritz Simmons, 1993)、これが、彼らが頻発に連続して抗生物質処置を受けなければならない理由である。

このための最も重要な抗生物質は、ペニシリン及びその誘導体、アンピリシン (*H. influenzae*) 及びカルベニシリン (Carbenicillin) (*P. aeruginosa*,  $\beta$ -ラクタマーゼ感受性ペニシリン誘導体, Davis 1980) である。広がったペニシリン耐性のために、 $\beta$ -ラクタマーゼ耐性ペニシリン誘導体 (メチシリン (methicillin)、オキサシリン (oxacillin)、セファロスポリン (cephalosporin) 及び化学療法剤) が、*S. aureus* の場合においては、特に重要である。

さらに、他の病原体、例えば、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae* (= *pneumococci*))、すなわち、バクテリア肺炎の最も一般的な病原剤及び腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) (例えば、肺炎杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)) が、肺の

感染の原因において重要であり、ペニシリンが、特に肺炎連鎖球菌の場合において最も重要な治療剤である(Davis, 1980)。

腸内細菌科及び腸球菌(Enterococci)は、とりわけ、胃腸管内に存在する(Balows, 1981)。ペニシリン及びその誘導体も、エンテロバクター(Enterobacter)、大腸菌(E. coli)、セラチア(Serratia)及び糞便連鎖球菌(*Streptococcus faecalis*)により引き起こされる処置において中心的な役割を演じる(Davis, 1980)。

既に1944年に、Avery (Avery, 1944) は、培地からの肺炎連鎖球菌による高分子量DNA の取り込みについて記載しており、自然の能力(competence)を示される過程が、バクテリアの進化において重要な役割を演じ、そしてそれ故、バクテリアの界に広がっている。

生理学的形質転換が、ハエモフィラス(Haemophilus)、スタフィロコッカス(*Staphylococcus*)、ネイセリア(*Neisseria*)、バチルス(*Bacillus*)及びアシネトバクター(*Acinetobacter*)において観察された(Davis, 1980)。結果として、水平遺伝子移入が広がっているシュードモナスも、その培地から高分子量DNA を取り込むことができる。

ヒトの天然微生物叢(気管、胃腸管、皮膚、粘膜、眼、等)のバクテリアは、このように、プラスミドDNA を取り込むことができる。取り込まれたDNA は、組換え事件によりその細胞自身のDNA (染色体、プラスミド) 内に組み込まれるようになることができ、そしてそれ故、その宿主のプロモーターの制御下に来る、すなわち、発現されるようになることができる。

約 300-500  $\mu$ g のプラスミド DNA/CF患者(これは、8.2Kb のプラスミド・サイズにおいて約  $5 \times 10^{13}$  分子に対応する)が投与されるとき、抗生物質耐性生物が肺微生物叢のバクテリアの中に、そしてまたその体の他の領域内に形成されるリスクが在る。既に述べたように、抗生物質及び特にアンピシリン耐性( $\beta$ -ラクタマーゼ)を作り出すことは、特にバクテリアの肺感染を患い、そして抗生物質により連続して同時処置されなければならないCF患者にとって特に有害である。特に、その理由は、従来使用される遺伝子治療の方法が未だ、完全な治癒又

は持続的な矯正をもたらしていないということである。

さらに、CFTRプラスミドを用いて導入されたアンピシリン耐性遺伝子が、その患者のDNA内に組み込まれるようになり、その細胞のプロモーターの中の1の制御下そこで発現され、そしてその遺伝子産物が能動的又は受動的に（例えば、炎症反応の場合においては細胞溶解）分泌されるかもしれないということを排除することができ

ない。局所的に放出された $\beta$ -ラクタマーゼは、一般的なバクテリア感染の場合においてさえペニシリン治療を妨害することができるであろう。

抗生物質耐性遺伝子を含まないDNAベクターの本発明に従う使用は、遺伝子治療によるAIDS (Lori & Galls, 1994) 又は癌患者 (Nabel, 1993) の治療においても有利である。なぜなら、両ケースにおいて、これらの患者は、通常、(AIDSの場合においては) それ自体の臨床徴候により、あるいは(癌の場合においては) 化学療法剤による治療により又は放射線療法により、免疫抑制されているからである。これらの患者におけるバクテリア感染は、抗生物質処置により予防され、又はそれによる管理下におかれる。

肺及び気管とは別に、遺伝子治療は、上記の局面下他の組織の処置についても考慮されなければならない：

筋肉組織：遺伝子治療用プラスミドは、例えば、インビボ種痘のために筋肉組織内に直接的に (Ulmer, 1993 ; Davis, 1993 ; Lew, 1994) 又は腫瘍中に (腫瘍種痘のための免疫刺激 ; Nabel, 1993 ; San, 1993) 注射されることができる。治療用プラスミドは、従来、このために低投与量において注射されてきた。なぜなら、その注射されたプラスミドDNAがその注射チャンネルの周囲に局在化して残るだけであるからである。全身的反応を得るためには、この治療用プラスミドの全身的投与又はより多量の投与量を避けることはできない。これはその後、血液系内でのプラスミドDNAの広がりをもたらす。

血液系：プラスミドDNA／ポリリシン／肝標的 heparin の結合体 (Chion, 1994) が、肝内の遺伝子治療のために静脈内に投与されることができる。これは、その血液系内でのプラスミドDNAの広がりをもたらす。

両ケース（筋肉組織、血液系）において、導入されたプラスミドは、バクテリアの病巣に到達し、これらのバクテリアに取り込まれ、そして感染が始まったとき抗生物質治療を妨害することができる。

腸：（例えば、腫瘍抑制遺伝子との）治療用プラスミドの結合体は、遺伝子治療のために腸内に直接的に導入されることができる（Arenas, 1994）。例えば、腸粘膜を介してのLDL レセプターをコードする遺伝子の遺伝子デリバリーも、考慮されている。導入されたプラスミドは、胃腸管のバクテリアに抗生物質耐性遺伝子を移入することができる。

皮膚：プラスミドDNA は、例えば、メラノーマ又は血友病B（第IX, X因子）の遺伝子治療のために、リポソームとの結合体として皮膚細胞内に直接的に取り込まれることができる（Alexander, 1994）。この方法で、皮膚微生物叢のバクテリアは、抗生物質耐性を得ることができる。

眼：眼の持続性ウイルス感染は、その眼の微生物叢のバクテリアに抗生物質耐性を移入するリスクを含む治療用プラスミドを用いた遺伝子治療により処置されることができる。

本発明のさらに好ましい態様においては、ベクターDNA であって、ヒト細胞内の内因性嚢胞性繊維症遺伝子の調節、活性化又は校正を引き起こす遺伝子又は遺伝子断片を含み、あるいは、このベクターDNA が抗生物質耐性遺伝子としてハイグロマイシン、クロラムフェニコール、スペクチノマイシン、ブラステシジンS、フレオマイシン、ブルオマイシン、プロマイシン、アプラマイシン又はテトロナシンについて耐性の遺伝子を含むことを特徴とする嚢胞性繊維症遺伝子を含むものが使用される。これらの抗生物質マーカーは、ヒト・ドメインにおいて限定された臨床的意味だけをもつ。なぜな

ら、対応の抗生物質は、通常、ヒトのために使用されないからである（例えば、ハイグロマイシン、Hyg<sup>r</sup>；獣医薬は“Rote Liste” 中にない；Rote Liste, 1994；Gritz, 1993又はクロラムフェニコール耐性Cm<sup>r</sup>は、致死感染の場合における隔離された、ひじょうに特殊な適用のためだけのものである；“Rote Liste”，1994）。

また、プラスミド増幅は、好ましくは、エリスロマイシン又はスペクチノマイシンを用いて行われることができる。

以下のものも好ましい：

a) ハイグロマイシン耐性マーカーをもつベクター

(上記参照；ハイグロマイシンBホストトランスフェラーゼ遺伝子)

ハイグロマイシンBは、ヒトのための臨床的意味をもっていない。治療用プラスミド内の Hyg<sup>r</sup>マーカー遺伝子の使用は、そのプラスミドが中性体液の細菌に移されるととき臨床的に意味のある抗生物質に対する耐性をもたらさない。

b) スペクチノマイシン耐性マーカーをもつベクター

(O-アデニルトランスフェラーゼ遺伝子)

スペクチノマイシンは、抗生物質として僅かな役割を演じるだけである。唯一の淋菌感染のためのスペクチノマイシン調製物が認可されている (“Rote Liste”)。治療用プラスミド内のスペクチノマイシン・マーカー遺伝子の使用は、そのプラスミドが中性の体微生物叢の細菌に移入されるときに臨床的意味をもつ抗生物質に対する耐性をもたらさない。

c) クロラムフェニコール耐性マーカーをもつベクター

(クロラムフェニコール・アセチル・トランスフェラーゼ遺伝子)

クロラムフェニコールは、限定された臨床的意味だけをもつ。そ

れは、致死性感染、例えば、リケッチア、チフス、パラチフス、サルモネラ敗血症及び髄膜炎のための隔離されたひじょうに特殊な場合においてだけ使用される。治療用プラスミド内のCm<sup>r</sup>マーカー遺伝子の使用は、そのプラスミドが中性肺微生物叢の細菌に移入されるとき臨床的意味のある抗生物質に対する耐性をもたらさない。

d) プラスティシジンS耐性マーカーをもつベクター

(BSデアミナーゼ)

BSは、微生物殺菌剤として使用される (Kamakura, 1987)。それは、ヒトにおける治療用抗生物質としては全く意味をもたない。BSは、タンパク質の生合成を阻害することにより細菌内及び真核生物内で働く。大腸菌 (E. coli) 及び

枯草菌 (*B. subtilis*) 内でバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) K55-S 1 から、対応耐性遺伝子、BSデアミナーゼ (ヌクレオシド・アミノヒドロラーゼ) をクローン化し、そして発現させることができる。大腸菌 (*E. coli*) 形質転換体は、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$  の投与量に対して耐性である (Kamakura, 1987)。

BS耐性遺伝子は、それ故、治療用プラスミド内の安全な選択マーカー遺伝子として使用されることができる。ヒトの体微生物叢のバクテリアに移入されたとき耐性の形成に伴う問題は全く予想されない。なぜなら、BSは、ヒトにおける治療のために認可されていないからである。

e) フレオマイシン/ブレオマイシン耐性マーカーをもつベクター

ブレオマイシンとフレオマイシンは、細胞DNA の特異的な部位において鎖破断を引き起こすことにより原核生物及び真核生物に対して作用する。ブレオマイシンだけが、抗生物質としてではなくむしろ

ろさまざまなヒト癌タイプの治療のための細胞分裂抑制剤として、その高い防毒性にも拘らず臨床的に意味がある。そのDNA がブレオマイシン/フレオマイシンへの結合により分断されることをたぶん防止する大腸菌 (*E. coli*) 内でのさまざまなBle<sup>r</sup>耐性遺伝子をクローン化し、そして発現させることができる。大腸菌 (*E. coli*) 形質転換体は、ブレオマイシン又はフレオマイシンを含む培地 ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  フレオマイシン) 上で選択されることができるであろう (Mulsant, 1988)

。

それ故、Ble<sup>r</sup>遺伝子は、治療用プラスミドのための安全な選択マーカー遺伝子である。ヒト体微生物叢のバクテリアに移入されるとき耐性の形成に伴う問題は全く予想されない。なぜなら、ブレオマイシン/フレオマイシンがヒトの治療のために認可されていないからである。

f) プロマイシン耐性マーカーをもつベクター

プロマイシンは、原核 (70S) 及び真核 (80S) リボソームの大きなリボソーム・サブユニットのA側と相互作用することにより翻訳の間のペプチド鎖伸長を阻害するアミノグリコシド抗生物質である。プロマイシンは、真核生物における主要なマーカーとして使用されることがもできる；それ故、その高い毒性のために

、それは、治療用抗生物質としてヒト医薬における意味を全くもたない。プロマイシンは、ストレプトミセス・アルボニガー (*Streptomyces alboniger*) により作り出され、それから、それは、ストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) 及び大腸菌 (*E. coli*) 内でそのプロマイシン耐性遺伝子 ( $Pac^R$  遺伝子、プロマイシン N-アセチル・トランスフェラーゼ) をクローン化し、そして発現させることもできる (Vara, 1985)。

$Pac^R$  遺伝子は、治療用プラスミドのための安全な選択マーカー

遺伝子として認められることができる。ヒト体微生物叢のバクテリアに移入されるとき耐性の形成に伴う問題は全く予想されない。なぜなら、プロマイシンは、ヒトにおける治療のために認可されていないからである。

g) アプ라마イシン耐性マーカーをもつベクター

アプ라마イシンは、アミノグリコシド抗生物質である。それは、臨床的意味を全くもたない。アミノグリコシド-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を担持する大腸菌 (*E. coli*) 内のアプ라마イシン耐性プラスミドが、記載されている (Hunter, 1992)。アプ라마イシン耐性遺伝子は、治療用プラスミドのための安全な選択マーカー遺伝子として認められることができる。ヒト体微生物叢のバクテリアに移入されるとき耐性の形成に伴う問題は全く予想されない。なぜなら、アプ라마イシンは、ヒトにおける治療のために認可されていないからである。

h) テトロナシン耐性マーカーをもつベクター

テトロナシン (Tn) は、イオン透過担体 (ionophore) - 形成性抗生物質の中の1つである。それは、飼料抗生物質として獣医薬においてのみ意味がある。テトロナシンに対する耐性遺伝子は、バクテロイデス・ルミニコラ (*Bacteroides ruminicola*) から単離された (Newbold, 1992)。テトロナシン耐性遺伝子は、治療用プラスミドのための安全な選択マーカーとして認められることができる。ヒト体微生物叢のバクテリアに移入されるとき耐性の形成に伴う問題は全く予想されない。なぜなら、テトロナシンは、ヒトにおける治療のために認可されていないからである。

本発明を以下の実施例によりさらに明示する。実験条件の詳細な説明は、J. S



ambrook, Molecular Cloning, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 中に含まれる

。

本発明を、以下の実施例、図面及び配列表によりさらに説明する。

図1は、pUC 18 Cm<sup>r</sup>/supEの制限酵素地図を示す。

#### 実施例1

##### ヒト肺及び腸微生物叢のバクテリアによるプラスミドの取り込み速度及び抗生物質耐性の測定

大腸菌 (E. coli) プラスミドDNA、例えば、pUC 18又はその誘導体が他の属のバクテリアにより取り込まれることができること、そしてアンピシリン耐性クローンを導くアンピシリン耐性遺伝子が、発現されることができることを、立証することを意図する。アンピシリン耐性微生物の形成の可能性を、支持体からのプラスミドDNAの取り込み速度及び宿主バクテリアの染色体DNA内への非相同的組換えによるアンピシリン耐性遺伝子の取り込み速度により決める。他のマーカー又は(終結コドンにより失活されたマーカー(上記参照)をもつプラスミドは、耐性のいずれのさらなる顕出も引き起こさない。

本実験を、以下のバクテリア種について行う：

グラム陰性：

インフルエンザ菌 (Haemophilus influenza)

緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa)

肺炎杆菌 (Klebsiella pneumoniae)

大腸菌 (Escherichia coli (WT))

グラム陽性：

ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)

肺炎連鎖球菌 (Streptococcus pneumoniae)

このために、各種量のプラスミドDNAを、各種条件下、上述の生物のカルチャーに添加した。

栄養培地中の液体培養を、等張性バッファー (NaCl,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) を使用して行う。各種濃度のプラスミドDNA (例えば、PUC 18 ;  $Ap^R$  遺伝子をもつ) を、これらのカルチャーに添加する。振とうしながら数時間のインキュベーションの後、抗生物質を添加する。それを、さらにインキュベートし、抗生物質を含む寒天上にプレートし、そして一連の希釈を、抗生物質を含まない寒天上で行う。生きた生物の数を、インキュベーション後に、得られたコロニーをカウントし、そして同定又は特徴付けすることにより、測定する。

あるいは、所定量のプラスミドと所定細菌数のバクテリアを、栄養寒天培地上にプレートし、そして数時間インキュベートし、抗生物質を、スプレーにより添加し、そして得られたコロニーを、カウントし、そして同定又は特徴付けする。所定量のプラスミド及び所定細菌数のバクテリアを、ナイロン・フィルター上に適用し、そして栄養寒天上で数時間そのフィルターをインキュベートすることもできる。その後、そのフィルターを、抗生物質を含む栄養寒天上に転写し、インキュベートし、そして得られたコロニーを、カウントし、そして同定又は特徴付けする。

## 実施例 2

### もはやアンピシリン選択マーカーを有しないpUC 18に基づく安全なベクターの構築

#### pUC 18のアンピシリン耐性遺伝子 ( $Amp^R$ ) の置換

1. pHPH0 からのハイグロマイシン耐性遺伝子 ( $Hyg^R$ ) によるもの  
ハイグロマイシン耐性遺伝子のDNA 配列 (Gritz, 1983) は、EMBL1.PJHPH の下、EMLBデータ・バンクに保存されている。

— PCR による  $Amp^R$  リーディング・フレームを もたない pUC 18 の増幅

プライマー 1 (pUC-U1) : PUC 18 配列の塩基対 2489-2513 ;

(配列番号 : 1)

5' CGAGTGAAGACACCATGGTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAG\*

プライマー 2 (pUC-L) : PUC 18 配列の塩基対 1628-1606 ;

(配列番号：2)

5' GGACTAGATCTGCTAGCTAACTGTCAGACCAAGTTTACTC

- Nco I / Nhe I による上記増幅物 (amplificate) の制限酵素処理
  - 調製のアガロース・ゲル+pUC 18増幅物の切り出し
  - Hyg<sup>r</sup>増幅物とのライゲーション
  - PCR によるpHDH0 からのHyg<sup>r</sup>リーディング・フレームの増幅
- プライマー 3 (Hyg R-U) : PHPHO 配列の塩基対260-278 ;

(配列番号：3)

5' GCTGTAGATCTCATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACG

プライマー 4 (Hyg R-L) : PHPHO 配列の塩基対1257-1276 ;

(配列番号：4)

5' CGACAGATCTGCTAGCTCATTATTCCTTTGCCCTCGGACG

- BspH I / Nhe I による上記増幅物の制限酵素処理
- 調製のアガロース・ゲル+Hyg<sup>r</sup>増幅物の切り出し
- pUC 18増幅物とのライゲーション (上記参照)
- E. coli XL 1 ブルー内形質転換、そしてハイグロマイシン B を含む培地 (1

25  $\mu$ g/ml) 上での選択

- 得られたプラスミドDNA pUC 18-Hyg<sup>r</sup>の単離
- pUC 18-Hyg<sup>r</sup>配列分析

\*) 上記プライマーの下線領域が、そのDNA 鋳型に結合する。

2. Hyg<sup>r</sup>のリーディング・フレーム内への終結コドンの挿入によるもの  
アンバー終結(UAG)を、PCR によりpUC 18-HygRの Hyg<sup>r</sup>遺伝子のリーディング・フレーム内に導入した。

supFは、supEよりも良好に抑制する ; G又はAの前にあるアンバー終結は、T又はCが後にあるよりも良好に抑制される。それ故、点突然変質を、2つの有利に位置する (単一制限酵素部位付近の) チロシン・コドン(TAT又はTAC)における突然変異PCR プライマーにより導入した。

1. TAC の 640-642位 (EMBL1. PJHPH) におけるTyr コドンからTAG (=アンバ

ー終結)

プライマー 8 (pUC 18-HygR-Mut640) (配列番号 : 8)

ー 5'GCAGATCTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATAGACTACATGGCG

- ー pUC 18-HygR鑄型に対するユニバーサル配列決定プライマーを用いたPCR
- ー Pst I /Nhe I による上記増幅物及びpUC 18-Hyg<sup>r</sup>の制限酵素処理
- ー 調製物アガロース・ゲル ; 600塩基対の増幅物及びpUC 18-HygRのより大きな断片の溶出

- ー 両断片のライゲーション
- ー E. coli ER1458 (supF) 内形質転換及びハイグロマイシン B を含む寒天培地 (125  $\mu$ g/ml) 上の選択
- ー pUC 18-HygR-Mut640のプラスミドDNA の単離
- ー pUC-HygR-Mut640のDNA 配列分析

2. TAT の1003-1005位 (EMBL1. PJHPH) におけるTry コドンからTAG

プライマー 9 (pUC 18-HygR-Mut1003) (配列番号 : 9)

ー 5'GCAGATCTCCGCGGCTCCGGGCGTAGATGCTCCGC

- ー pUC 18-HygR-Mut640鑄型に対するユニバーサル配列決定プライマーを用いたPCR

- ー Ksp I /Nhe I による上記増幅物及びpUC 18-Hyg<sup>r</sup>-Mut640の制限酵素処理
- ー 調製物アガロース・ゲル ; 240塩基対の増幅物及びpUC 18-HygR-Mut640のより大きな断片の溶出
- ー 両断片のライゲーション
- ー E. coli ER1458 (supF) 内形質転換及びハイグロマイシン B を含む寒天培地 (125  $\mu$ g/ml) 上の選択

- ー pUC 18-HygR-Mut640+1003のプラスミドDNA の単離
- ー pUC-HygR-Mut640+1003のDNA 配列分析

両プラスミド、 pUC-HygR-Mut640と pUC18-HygR-Mut640+1003を、E. coli

i ER1562 (supF, supE) 内でチェックする。両プラスミドは、もはやハイグロマイシンB耐性を仲介しないはずである。

### 3. 栄養要求性マーカー・オペロンproAB によるもの

proAB オペロンのDNA 配列 (Deutch, 1984) は、EMBL1.ECPROABの下、EMBLデータベース・バンク内に保存されている。

a) proB シャイン-ダルガルノ (Shine-Dalgarno (SD)) 領域をもつproAB オペロンのクローニングのために (Amp<sup>r</sup>のSDをもたないプロモーターの使用)

— PCR による Amp<sup>r</sup>をもたず、かつ、SDをもたないpUC 18の増幅

プライマー 5 (pUC-U2) : pUC 18配列の塩基対2500-2524 ;

(配列番号 : 5)

**5' CGAGTGAAGACACCATGGCAATATTATTGAAGCATTTATCAGG**

プライマー 2 (pUC-L) : pUC 18配列の塩基対1628-1606 ;

(配列番号 : 2)

**5' GGACTAGATCTGCTAGCTAACTGTCAGACCAAGTTTACTC**

— Nco I / Nhe I による上記増幅物の制限酵素処理

— 調製物アガロース・ゲル+pUC 18-増幅物の切り出し

— proAB オペロン (以下参照) の増幅物とのライゲーション

— PCR によるE. coli K12野生型DNA からの (proB SD領域をもつ) proAB オペロンの増幅

プライマー 6 (proAB-U) : ECPROAB, EMBL1 の塩基対341-362 ;

(配列番号 : 6)

**5' GCTGTAGATCTCCATGGCAGAGAATCATGAGTGAC**

プライマー 7 (proAB-L) : ECPROAB, EMBL1 の塩基対2692-2672 ;

(配列番号 : 7)

**5' CGACAGATCTGCTAGCTCATTACGCACGAATGGTGTAAATC**

— Nco I / Nhe I による上記増幅物の制限酵素処理

— 調製物アガロース・ゲル+proAB 増幅物の切り出し

- pUC 18-増幅物（上記参照）とのライゲーション
- E. coli JM83( $\Delta$ lac -pro)内形質転換
- プロリンを含まない最小培地上での proAB<sup>+</sup>クローンの選択
- 得られたプラスミドDNA pUC 18-proAB(SD)の単離
- pUC 18-proAB(SD)の配列分析
- b) proB SD領域をもたないproAB オペロンのクローニングのために（プロモーター+ Amp<sup>r</sup>のSDの使用）
  - PCR による Amp<sup>r</sup>リーディング・フレームをもたないpUC 18の増幅  
プライマー1（pUC-U1）とプライマー2（pUC-L）（上記参照）
  - Nco I /Nhe I による上記増幅物の制限酵素処理
  - 調製物アガロース・ゲル+pUC 18-増幅物の切り出し
  - （proB SD領域をもたない）proAB オペロン（以下参照）の増幅物とのライゲーション
  - 2. a) 中のものと同じのプライマーをもつproAB オペロンの増幅（プライマー6（proAB-U）及びプライマー7（proAB-L））
  - （proBの翻訳開始において直接的にそのSD領域の下流を切断する）BspHI 及び Nhe I による制限酵素処理
  - 調製物アガロース・ゲル+proAB 増幅物の切り出し
  - pUC 18-増幅物（上記参照）とのライゲーション
  - E. coli JM83( $\Delta$ lac -pro)内形質転換
  - プロリンを含まない最小培地上での proAB<sup>+</sup>クローンの選択
  - 得られたプラスミドDNA pUC18-proAB の単離
  - pUC 18-proAB の配列分析

proAB は、オペロンとして存在する。すなわち、proAB オペロンの両遺伝子が、1のプロモーターから出発して、最初に proB（ $\gamma$ -グルタミル・キナーゼ、GK）次に下流の proA（ $\gamma$ -グルタミル・ホスフェート・レダクターゼ、GPR）、転写される。GKとGPR は、GKからGPR への $\gamma$ -グルタミル・ホスフェートの直接伝達を保証する分子複合体を形成する（Deutch, 1984）。GK対GPR の正しい化学

量論比は、それ故、その複合体の活性のために重要である。1 のオペロン内の個々の成分の相対的な発現速度は、その個々の成分の翻訳速度によっても測定される。従って、proAB オペロンの2の構築物、相同性SDをもつ1と Amp<sup>r</sup>遺伝子のSDをもつ1を、調製した。

4. 以下の安全ベクター内への、CMV プロモーター／エンハンサー及びヒトCFTR遺伝子をもつpCMV-CFTR 936C (Alton, 1993)からの挿入物の導入によるもの：

- pUC 18-HygR
- pUC 18-proAB (SD)
- pUC 18-proAB
- pUC 18-HygR-Mut640
- pUC 18-HygR-Mut640+1003。

得られた構築物のプラスミドDNA の単離、精製及びDNA 配列分析。(Amp<sup>r</sup>遺伝子をもつpUC 18に基づき) pCMV-CFTR 935Cに比較して、CFインビトロ・モデル又はCFマウス・モデルにおいて、得られた構築物を調べる。

### 実施例 3

クロラムフェニコール・アセチル・トランスフェラーゼ遺伝子のリーディング・フレーム内へのアンバー終結コドンの挿入、pSU2719 (Martinez, 1988) からの出発、及びpUC 18 Δ Amp<sup>r</sup>内での再クローニング

- supE／アンバー終結へのPCR 突然変異誘発 (グルタミン、コドン／CAA 又はCAG→UAG アンバー終結)
- 全プロセス段階 (PCR、DNA 制限酵素処理、ライゲーション、E. coli形質転換) を、Sambrook et al., (1989) に従って行った。

3. 1 全調節シグナルをもつpSU 2719からのcat 遺伝子の増幅；並びにそのcat 遺伝子のリーディング・フレーム内への塩基対位置=103 におけるアンバー終結の挿入

プライマー対 cat-supE 103-1 / 2 : (470塩基対断片をもたらす。)

プライマー1 : pSU 2720の 575- 559塩基対 (配列番号 : 10)

5' GCACGGTCGACTCATGA TCCGGCGGTGCTTTTGC

プライマー2 : pSU 2719の 115-138塩基対 (配列番号: 11)

5' GCAGGTCGACACTAGTTATAGGTACATTGAGCAAC

プライマー対 Cm-supE 103-3/4 : (625塩基対断片をもたらす。)

プライマー3 : pSU 2719の 116-95塩基対 (配列番号: 12)

5' CGACGTCGACTCTAGA CCGTCAGCTGGATATTAC

プライマー4 : pSU 2719の1837-1858塩基対 (配列番号: 13)

5' GCACGGGATCCTCATGAGAAGATCATCTTATTAATCAG

— プライマー対 1/2 と 3/4 を用いて各々pSU 2719に対して第1 PCRを行う

— Spe I による→プライマー対 1/2 (0.47K塩基対DNA断片) Xba I による→プライマー対 3/4 (0.62K塩基対DNA断片) のPCR生成物の制限酵素処理

— 両断片のライゲーションは、1.1K塩基対のDNA断片をもたらす

— プライマー1と4を用いたライゲーションを介した第2 PCR

— Rca I によるPCR断片の制限酵素処理

3.2 pUC 18の制限酵素処理:

— Rca I によるpUC 18の制限酵素処理は、3つの断片; 1.6K塩基対、1K塩基対、0.1K塩基対をもたらす。

— 上記 1.6K塩基対断片の単離

3.3 1.1K塩基対PCR断片との 1.6K塩基対pUC 18断片のライゲーションは、  
pUC 18 Cm<sup>r</sup>/supEといわれるサイズ 2.7K塩基対の環状プラスミドをもたらす (図1)

— E. coli DH1 (ATCC 33849; supE44) におけるライゲートされたプラスミドの形質転換及び、アンバー終結の抑制による、クロラムフェニコール寒天プレート (40 µg/ml) 上のCm<sup>r</sup>クローンを選択

3.4 以下による、得られたプラスミド pUC 18 Cm<sup>r</sup>/supEの特徴付け



— 上記突然変異部位のDNA 配列分析

— supEサプレッサー突然変異を全く含まないE. coli株(E. coli JM83(ATCC 35607 ; supE))における形質転換及びクロラムフェニコール寒天上での選択は、いずれの形質転換体をももたらさない。なぜなら、この株は、supE<sup>-</sup>であるからである。すなわち、Cm<sup>r</sup>遺伝子は、アンバー終結によりここで失活されない。

3.5 実施例 2.4と同様の、pUC 18 Cm<sup>r</sup>/supE内でのpCMV-CFTR 936CからのCMV-CFTR挿入物の再クローニング

## 關 連 文 獻

Alexander, M.Y., Bidichandani, S.I., Robinson, C.J.M. and Akhurst, R.J.: "Treatment of Hemophilia B by Somatic Cell Gene Therapy Using Keratinocytes as a Gene Delivery System." J. of Cellular Biochemistry 18A (1994) Abstract DZ400

Alton, E.W.F.W., Middleton, P.G., Caplen, N.J., Smith, S.N., Steel, D.M., Munkonge, F.M., Jeffery, P.K., Geddes, D.M., Hart, S.L., Williamson, R., Fasold, K.I., Miller, A.D., Dickinson, P., Stevenson, B.J., McLachlan, G., Dorin, J.R. and Porteus, D.J.: "Non-invasive liposome-mediated gene delivery can correct the ion transport defect in cystic fibrosis mutant mice". Nature Genetics 5 (1993) pp. 135-142

Arenas, R., Chmura, S.J., Otto, G. and Westbrook, C.A.: "Genetic Modification of Rodent Gut Epithelium by Gene Therapy Using Liposomal Delivery Systems". J. of Cellular Biochemistry 18A (1984) Abstract DZ101

Balows, A., Hauser Jr., W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J.: Manual of Clinical Microbiology, Fifth Edition (1991), American Society for Microbiology, Washington D. C.

Chiou, H.C., Merwin, J.R., Levine, S.M., Wimler, K.M., Salafia, M.A. and Spitalny, G.L.: "Expression of Secreted and Intr

acellular Proteins Following Receptor-Mediated Gene Transfer to Hepatocytes In Vivo." J. of Cellular Biochemistry 18A (1994) Abstract DZ109

Cotten, M., Wagner, E., Zatloukal, K., Buschle, M., Chiocca, S., Plank, C., Zauner, W., Schmidt, W. and Birnstiel, M.L.: "Receptor-Mediated Gene Delivery." J. of Cellular Biochemistry 18A (1994) Abstract DZ002

Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N. and Ginsberg, H.S.: Microbiology, Third Edition (1980), Harper International Edition

Davis, H.L., Demeneix, B.A., Quantin, B., Coulombe, J. and Whalen, R.G., "Plasmid DNA is Superior to Viral Vectors for Direct Gene Transfer into Adult Mouse Skeletal Muscle." Human Gene Therapy 4 (1993) pp.733-740

Debs, R.J., Zhu, N. and the Regents of the University of California: "Gene Therapy for Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Activity (CFTR)." W093/1224; A1; 17.12.91 US;

Deutch, A.H., Rushlow, K.E. and Smith, C.J.: "Analysis of the Escherichia coli proAB locus by DNA and protein sequencing." NAR 12 (1984) pp. 6337-6355

Dodge, J.A., Brock, D.J.H. and Widdicombe, J.H.: Cystic Fibrosis, Current Topics, Volume 1 (1993), John Wiley & Sons

FitzSimmons, S.C.: "The changing epidemiology of cystic fibrosis." The Journal of Pediatrics 122 (1993) pp.1-9

Gao, L., Wagner, E., Cotten, M., Agarwal, C., Harris, C., Romer, M., Miller, L., Hu, P.-C. and Curiel, D.: "Direct In Vivo Gene Transfer to Airway Epithelium Employing Adenovirus-Polylysine-DNA Complexes." Human Gene Therapy 4 (1993) pp. 17-24

Gritz, L. and Davies, J.: "Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae." Gene (1983) pp. 179-188

Hunter, J.E.B., Shelley, J.C., Walton, J.R., Hart, C.A. and Bennett, M.: "Apramycin resistance plasmids in Escherichia coli: possible transfer to Salmonella typhimurium in calves." Epidemiol. Infect. 108 (1992) pp. 271-278

Hyde, S.C., Gill, D.R., Higgins, C.F., Trezise, A.E.O., MacVinish, L.J., Cuthbert, A.W., Ratcliff, R., Evans, M.J. and Colledge, W.H.: "Correction of the ion transport defect in cystic fibrosis transgenic mice by gene therapy." Nature 362 (1993) pp. 250-255

Jimenez, A. and Davies, J.: "Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*." *Nature* 287 (1980) pp.869

Kamakura, T., Kobayashi, T., Tanaka, T., Yamaguchi, I. and Endo, T.: "Cloning and Expression of a New Structural Gene for Blastidicidin S Deaminase, a Nucleoside Aminohydrolase." *Agric. Biol. Chem* 51 (1987) pp.3165-3168

Lew, D. and Latimer, T.: "Long Term Persistence of Plasmid DNA after Intramuscular Injection in Mice." *J. of Cellular Biochemistry* 18A (1994) Abstract DZ120

Lori, F., Lisziewicz, J., Smythe, J., Cara, A., Bunnag, T.A., Curiel, D. and Gallo, R.C.: "Rapid protection against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication mediated by high efficiency non-retroviral delivery of genes interfering with HIV-1 tat and gag." *Gene Therapy* 1 (1994) pp.27-31

Morgan, R.A. and Anderson, W.F.: "Human Gene Therapy." *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) pp. 191-217

Mulsant, P., Gatignol, A., Dalens, M. and Tiraby, G.: "Phleomycin Resistance as a Dominant Selectable Marker in CHO Cells." *Somatic Cell and Mol. Genetics* 14 (1988) pp. 243-252

Nabel, G.I., Nabel, E.G., Yang, Z.-Y., Fox, B.A., Plautz, G.

E., Gao, X., Huang, L., Gordon, D. and Chang, A.E.: "Direct gene transfer with DNA liposome complexes in melanoma: Expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans," PNAS USA 90 (1993) pp. 11307-11311

Nabel, G.J., Fox, B.A., Post, L., Thompson, C.B., Woffendin, C.: "Clinical Protocol: A Molecular Genetic Intervention for AIDS-Effects of a Transdominant Negative Form of Rev." Human Gene Therapy 5 (1994) pp. 79-92

Newbold, C.J., Wallace, R.J. and Watt, N.D.: "Properties of ionophore-resistant *Bacterioides ruminicola* enriched by cultivation in the presence of tetracycline." J. of Appl. Bacteriol. 72 (1992) pp. 65-70

Recombinant Advisory Committee (RAC) DATA MANAGEMENT Report-June 1993; Human Gene Therapy 5 (1994) pp. 135-136

Rote Liste 1994. Arzneimittelverzeichnis des BfArM, ECV, Aulendorf/Württ.

San, H., Yang, Z.-Y., Pompili, V.J., Jaffe, M.L., Plautz, G.E., Xu, L., Felbner, J., Wheeler, C.J., Felgner, P.L., Gao, X., Huang, L., Gordon, D., Nabel, G.J. and Nabel, E.G.: "Safety and Short-Term Toxicity of a Novel Cationic Lipid Formulation for Human Gene Therapy." Human Gene Therapy 4 (1993) pp. 781-788

Seed, B.: "Purification of genomic sequences from bacteriophage libraries by recombination and selection in vivo." NAR (1983) p. 2427-2445

Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dworki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A., Hawe, L.A., Leander, K.R., Martinez, D., Perry, H.C., Shiver, J.W., Montgomery, D.L. and Liu, M. A.: "Heterologous Protection Against Influenza by injection of DNA Encoding a Viral Protein." Science 259 (1993) pp. 1745-1749

Wagner, E., Zenke, M., Cotten, M., Beug, H. and Birnstiel, M. L.: "Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells." PNAS USA 87 (1990) pp. 3410-3414

Whitsett, J.A., Dey, C.R., Stripp, B.R., Wikenheiser, K.A., Clark, J.C., Wert, S.E., Gregory, R.J., Smith, A.E., Cohn, J. A., Wilson, J.M. and Engelhardt, J.: "Human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator directed to respiratory epithelial cells of transgenic mice." Nature Genetics 2 (1992) pp. 13-20

Yoshimura, K., Rosenfeld, M.A., Nakamura, H., Scherer, E.M., Pavirani, A., Lecocq, J.-P. and Crystal, R.G.: "Expression of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regul

ator gene in the mouse lung after in vivo intratracheal plasmid-mediated gene transfer." NAR 20 (1992) pp. 3233-3240

Zabner, J., Couture, L.A., Gregory, R.J., Grahem, S.M., Smith, A.E. and Welsh, M.J.: "Adenovirus-mediated Gene Transfer Transiently Corrects the Chloride Transport Defect in Nasal Epithelia of Patients with Cystic Fibrosis." Cell 75 (1993) pp. 207-216

Zakharyan, R.A., Gasparyan, E.T. and Aposhyan, G.V.: "Transport of a  $\beta$ -lactamase gene into human cells by artificial virus-like particles and its expression." Biol. Zh. Arm. (1982) pp. 730-734

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)

Martinez, E., Bartolomé, B. and de la Cruz, F.: "pACYC184-derived vectors containing the multiple cloning site and lacZ  $\alpha$  reporter gene of pUC8/9 and pUC18/19 plasmids. Gene 68 (1988) 159-162



## 配 列 表

## (1) 一般情報 :

## (i) 出願人 :

(A) 名称 : BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

(B) 街 : Sandhofer Str. 116

(C) 市 : Mannheim

(E) 国 : Germany

(F) 郵便番号 (ZIP) : D-68305

(G) 電話 : 08856/60-3446

(H) ファックス : 08856/60-3451

(ii) 発明の名称 : 抗生物質耐性遺伝子を含まないDNA ベクター  
を使用した遺伝子治療方法

(iii) 配列の数 : 13

## (iv) コンピューター読み込み形態 :

(A) 媒体タイプ : フロッピー・ディスク

(B) コンピューター : IBM PC互換性

(C) オペレーティング・システム : PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア : PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(EP0)

## (vi) 先行出願データ :

(A) 出願番号 : DE P 44 10 188.0

(B) 出願日 : 1994年5月24日

## (vi) 先行出願データ :

(A) 出願番号 : EP 94112165.9

(B) 出願日 : 04-AUG-1994

## (2) 配列番号 : 1 についての情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 43塩基対
- (B) タイプ : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 分子タイプ : cDNA

## (xi) 配列番号 : 1 :

CGAGTGAAGA CACCATGGTC TTCCTTTTTC AATATTATTG AAG

43

## (2) 配列番号 : 2 についての情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 40塩基対
- (B) タイプ : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 分子タイプ : cDNA

## (xi) 配列番号 : 2 :

CGACTAGATC TGCTAGCTAA CTGTCAGACC AAGTTTACTC

40

## (2) 配列番号 : 3 についての情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 39塩基対
- (B) タイプ : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 分子タイプ : cDNA

## (xi) 配列番号 : 3 :

GCTGTAGATC TCATGAAAAA GCCTGAACTC ACCGCGACG

39

## (2) 配列番号 : 4 についての情報 :

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：40塩基対

(B) タイプ：核酸

(C) 鎖の数：1本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子タイプ：cDNA

(xi) 配列番号：4：

CGACAGATCT GCTAGCTCAT TATTCCTTTG CCCTCGGACG

40

(2) 配列番号：5についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：43塩基対

(B) タイプ：核酸

(C) 鎖の数：1本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子タイプ：cDNA

(xi) 配列番号：5：

CGAGTGAAGA CACCATGGCA ATATTATTGA AGCATTTATC AGG

43

(2) 配列番号：6についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：35塩基対

(B) タイプ：核酸

(C) 鎖の数：1本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子タイプ：cDNA

(xi) 配列番号：6：

GCTGTAGATC TCCATGGCAG AGAATCATGA GTGAC

35

(2) 配列番号：7についての情報：

## (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：40塩基対

(B) タイプ：核酸

(C) 鎖の数：1本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

## (ii) 分子タイプ：cDNA

## (xi) 配列番号：7：

CGACAGATCT GCTAGCTCAT TACGCACGAA TGGTGTATC

40

## (2) 配列番号：8についての情報：

## (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：44塩基対

(B) タイプ：核酸

(C) 鎖の数：1本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

## (ii) 分子タイプ：cDNA

## (xi) 配列番号：8：

GCAGATCTCG GACCGCAAGG AATCGGTCAA TAGACTACAT GGCG

44

## (2) 配列番号：9についての情報：

## (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：35塩基対

(B) タイプ：核酸

(C) 鎖の数：1本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

## (ii) 分子タイプ：cDNA

## (xi) 配列番号：9：

GCAGATCTCC GCGGCTCCGG GCGTAGATGC TCCGC

35

## (2) 配列番号：10についての情報：

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 34塩基対
- (B) タイプ : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 分子タイプ : cDNA

## (xi) 配列番号 : 10 :

GCACGGTCGA CTCATGATCC GCGGTGCTT TTGC

34

## (2) 配列番号 : 11についての情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 35塩基対
- (B) タイプ : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 分子タイプ : cDNA

## (xi) 配列番号 : 11 :

GCAGGTCGAC ACTAGTTATA GGTACATTGA GCAAC

35

## (2) 配列番号 : 12についての情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 35塩基対
- (B) タイプ : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 分子タイプ : cDNA

## (xi) 配列番号 : 12 :

CGACGTCGAC TCTAGACCGT TCAGCTGGAT ATTAC

35

## (2) 配列番号 : 13についての情報 :

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：38塩基対

(B) タイプ：核酸

(C) 鎖の数：1本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

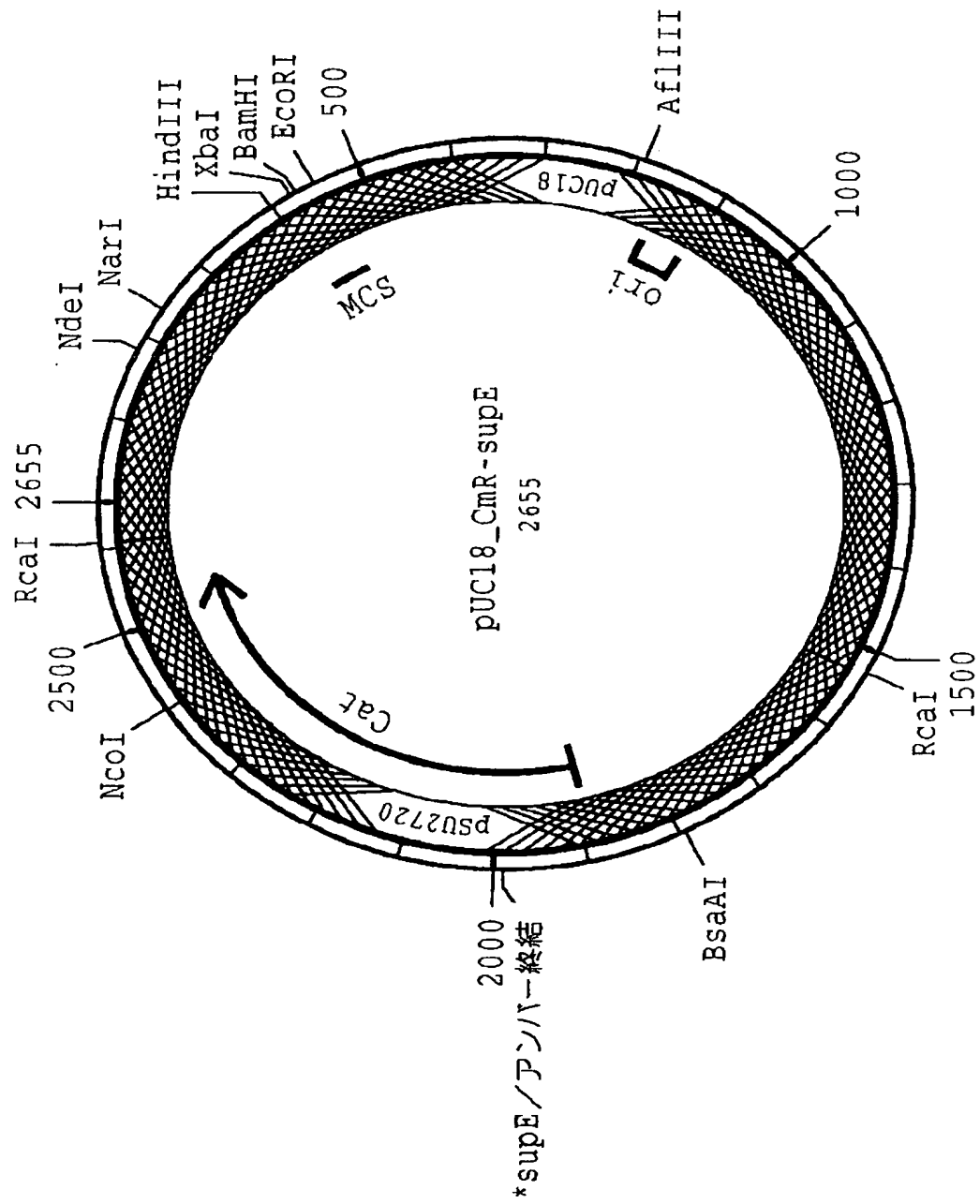
(ii) 分子タイプ：cDNA

(xi) 配列番号：13：

GCACGGGATC CTCATGAGAA GATCATCTTA TTAATCAG

【図1】

Fig. 1



## 【手続補正書】

【提出日】1996年9月20日

## 【補正内容】

## 請求の範囲

1. 遺伝子治療による哺乳類又はヒトの治療のためのベクターDNA を含んで成る医薬製剤であって、そのベクターDNA が、内因性遺伝子の発現、あるいは、そのベクターDNA によりその哺乳類又はヒトの細胞内に導入された遺伝子の発現の、調節、校正又は活性化を引き起こしそのベクター核酸が、活性抗生物質耐性遺伝子を含まないような、医薬製剤。

2. 遺伝子治療によるヒトの治療のためのベクターDNA を含んで成る医薬製剤であって、そのベクターDNA が、内因性遺伝子の発現、あるいは、そのベクターDNA によりそのヒト細胞内に導入された遺伝子の発現の、調節、校正又は活性化を引き起こし、そのベクター核酸が、ハイグロマイシン、クロラムフェニコール、スペクチノマイシン、プラスティシジンS、フレオマイシン、ブレオマイシン、プロマイシン、アプラマイシン又はテトロナシンについての耐性遺伝子を含むような、医薬製剤。

3. 遺伝子治療処置が、気管内、腸管内又は皮膚表面上で行われる、請求項1又は2に記載の医薬製剤。

4. ベクターDNA が、嚢胞性繊維症のための内因性遺伝子の発現の、調節又は活性化を引き起こし、又はその嚢胞性繊維症をコードするような、請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬製剤

5. 医薬製剤が、気管内での適用のためのエアロゾルとして製造される、請求項4に記載の医薬製剤。

6. 哺乳類細胞内での、内因性嚢胞性繊維症遺伝子の、調節、活性化又は校正を引き起こす遺伝子又は遺伝子断片を含み、あるいは、哺乳類細胞内で発現されることができる嚢胞性繊維症遺伝子を含むベクターDNA であって、このベクターDNA が、失活された抗生物

質耐性遺伝子又は栄養要求性マーカーをコードする遺伝子を含むような、ベクタ



一DNA。

7. 哺乳類細胞内での、内因性嚢胞性繊維症遺伝子の、調節、活性化、又は校正を引き起こす遺伝子又は遺伝子断片を含み、あるいは、哺乳類細胞内で発現されることができる嚢胞性繊維症遺伝子を含むベクターDNA であって、このベクターDNA が、ハイグロマイシン、クロラムフェニコール、スペクチノマイシン、プラスティシジンS、フレオマイシン、ブレオマイシン、プロマイシン、アプラマイシン又はテトロナシンについての耐性遺伝子を含むような、ベクターDNA。

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In: International Application No.  
PCT/EP 95/01006

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/63 A61K48/00 C12N15/85		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	P.H. POUWELS ET AL. 'Cloning vectors' 1985, ELSEVIER, AMSTERDAM, NEW YORK, OXFORD *page VIII-A-a-i-1* ---	1
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 36, 1991 pages 24471-24476, J.L. CHOU ET AL. 'Characterisation of the promoter region of CFTR gene' *see the whole articles*	2,3,6,7
X	B.M. SUTHERLAND ET AL. 'DNA Damage and Repair in Human Tissues' 1990, PLENUM PRESS, NEW YORK *pages 215-223* --- -/-	2,3,6,7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30 June 1995		17.07.95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 3818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer  Marie, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No  
PCT/EP 95/01006

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,89 00605 (CODON) 26 January 1989 *see the whole patent* ---	2,3,6,7
X	EP,A,0 363 127 (ELI LILLY AND CO.) 11 April 1990 *see the whole patent* ---	2,3,6,7
X	GB,A,2 244 712 (MEDICAL RESEARCH COUNCIL) 11 December 1991 *see the whole patent* ---	2,3,6,7
X	EP,A,0 135 291 (ELI LILLY AND CO.) 27 March 1985 *see the whole patent* ---	2,3,6,7
X	NATURE, vol. 347, 1990 pages 382-386, R.J. GREGORY ET AL. 'Expression and characterisation of CFTR' *see the whole articles* ---	1,4
X	HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 2, no. 8, 1993 pages 1253-1261, Y. YANG ET AL. 'Molecular basis of defective anion transport in L cells expressing recombinant forms of CFTR' *see the whole articles* ---	1,4
X	AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 7, 1992 pages 349-356, T.R. FLOTTE ET AL. 'Gene expression from adeno-associated virus vectors in airway epithelial cells' *see the whole articles* -----	1,4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No  
PCT/EP 95/01006

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8900605	26-01-89	AU-A- 2263288 EP-A- 0368926 US-A- 5017478	13-02-89 23-05-90 21-05-91
EP-A-363127	11-04-90	CA-A- 1332049 JP-A- 2171198	20-09-94 02-07-90
GB-A-2244712	11-12-91	NONE	
EP-A-135291	27-03-85	AU-B- 565625 AU-A- 3089884 CA-A- 1278540 GB-A, B 2143534 JP-B- 7012312 JP-A- 60047685 US-A- 4960704	24-09-87 24-01-85 02-01-91 13-02-85 15-02-95 15-03-85 02-10-90

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	9637-4B	C 1 2 P 21/02	C
// C 1 2 N 5/10		9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 P 21/02		9281-4B	5/00	B

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP, US

(72) 発明者 ポーテアス, デビッド  
イギリス国, エジンバラ イーエイチ4  
8イーエイチ, カンモ ガーデنز 8,  
チュリートリーズ